

**Darstellung von Heterochromatinfractionen
aus Mäuseleberzellkernen mit Hilfe von
Restriktionsnukleasen**

Konrad Freiherr von Oefele

1980

DISSERTATIONS UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Aus dem Institut für Physiologische Chemie,
Physikalische Biochemie und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher -
Prof. Dr. E. M. Klingenberg -
Prof. Dr. F. Miller -
Prof. Dr. H. G. Zachau

DARSTELLUNG VON HETEROCHROMATINFRAKTIONEN AUS
MÄUSELEBERZELLKERNEN MIT HILFE VON RESTRIKTIONS-
NUKLEASEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Konrad Freiherr von Oefele
aus München
im Jahre 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. Wolfram Hörz

Mitberichterstatter: Professor Dr. Hans Georg Zachau

Dekan: Professor Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 1980



1.	Einleitung und Vorbemerkungen	1
2.	Zusammenfassung der Arbeit	2
3.	Ergebnisse der Untersuchung	3
4.	Diskussion der Ergebnisse	4
5.	Schlussfolgerungen	5
6.	Literaturverzeichnis	6
7.	Anhang	7
8.	Bibliographie	8
9.	Abkürzungen	9
10.	Verzeichnis der Abbildungen	10
11.	Verzeichnis der Tabellen	11
12.	Verzeichnis der Formeln	12
13.	Verzeichnis der Symbole	13
14.	Verzeichnis der Abkürzungen	14
15.	Verzeichnis der Abkürzungen	15
16.	Verzeichnis der Abkürzungen	16
17.	Verzeichnis der Abkürzungen	17
18.	Verzeichnis der Abkürzungen	18
19.	Verzeichnis der Abkürzungen	19
20.	Verzeichnis der Abkürzungen	20
21.	Verzeichnis der Abkürzungen	21
22.	Verzeichnis der Abkürzungen	22
23.	Verzeichnis der Abkürzungen	23
24.	Verzeichnis der Abkürzungen	24
25.	Verzeichnis der Abkürzungen	25
26.	Verzeichnis der Abkürzungen	26
27.	Verzeichnis der Abkürzungen	27
28.	Verzeichnis der Abkürzungen	28
29.	Verzeichnis der Abkürzungen	29
30.	Verzeichnis der Abkürzungen	30
31.	Verzeichnis der Abkürzungen	31
32.	Verzeichnis der Abkürzungen	32
33.	Verzeichnis der Abkürzungen	33
34.	Verzeichnis der Abkürzungen	34
35.	Verzeichnis der Abkürzungen	35
36.	Verzeichnis der Abkürzungen	36
37.	Verzeichnis der Abkürzungen	37
38.	Verzeichnis der Abkürzungen	38
39.	Verzeichnis der Abkürzungen	39
40.	Verzeichnis der Abkürzungen	40
41.	Verzeichnis der Abkürzungen	41
42.	Verzeichnis der Abkürzungen	42
43.	Verzeichnis der Abkürzungen	43
44.	Verzeichnis der Abkürzungen	44
45.	Verzeichnis der Abkürzungen	45
46.	Verzeichnis der Abkürzungen	46
47.	Verzeichnis der Abkürzungen	47
48.	Verzeichnis der Abkürzungen	48
49.	Verzeichnis der Abkürzungen	49
50.	Verzeichnis der Abkürzungen	50
51.	Verzeichnis der Abkürzungen	51
52.	Verzeichnis der Abkürzungen	52
53.	Verzeichnis der Abkürzungen	53
54.	Verzeichnis der Abkürzungen	54
55.	Verzeichnis der Abkürzungen	55
56.	Verzeichnis der Abkürzungen	56
57.	Verzeichnis der Abkürzungen	57
58.	Verzeichnis der Abkürzungen	58
59.	Verzeichnis der Abkürzungen	59
60.	Verzeichnis der Abkürzungen	60
61.	Verzeichnis der Abkürzungen	61
62.	Verzeichnis der Abkürzungen	62
63.	Verzeichnis der Abkürzungen	63
64.	Verzeichnis der Abkürzungen	64
65.	Verzeichnis der Abkürzungen	65
66.	Verzeichnis der Abkürzungen	66
67.	Verzeichnis der Abkürzungen	67
68.	Verzeichnis der Abkürzungen	68
69.	Verzeichnis der Abkürzungen	69
70.	Verzeichnis der Abkürzungen	70
71.	Verzeichnis der Abkürzungen	71
72.	Verzeichnis der Abkürzungen	72
73.	Verzeichnis der Abkürzungen	73
74.	Verzeichnis der Abkürzungen	74
75.	Verzeichnis der Abkürzungen	75
76.	Verzeichnis der Abkürzungen	76
77.	Verzeichnis der Abkürzungen	77
78.	Verzeichnis der Abkürzungen	78
79.	Verzeichnis der Abkürzungen	79
80.	Verzeichnis der Abkürzungen	80
81.	Verzeichnis der Abkürzungen	81
82.	Verzeichnis der Abkürzungen	82
83.	Verzeichnis der Abkürzungen	83
84.	Verzeichnis der Abkürzungen	84
85.	Verzeichnis der Abkürzungen	85
86.	Verzeichnis der Abkürzungen	86
87.	Verzeichnis der Abkürzungen	87
88.	Verzeichnis der Abkürzungen	88
89.	Verzeichnis der Abkürzungen	89
90.	Verzeichnis der Abkürzungen	90
91.	Verzeichnis der Abkürzungen	91
92.	Verzeichnis der Abkürzungen	92
93.	Verzeichnis der Abkürzungen	93
94.	Verzeichnis der Abkürzungen	94
95.	Verzeichnis der Abkürzungen	95
96.	Verzeichnis der Abkürzungen	96
97.	Verzeichnis der Abkürzungen	97
98.	Verzeichnis der Abkürzungen	98
99.	Verzeichnis der Abkürzungen	99
100.	Verzeichnis der Abkürzungen	100

Herrn Professor Dr. H. G. Zachau und Herrn
Privatdozent Dr. W. Hörz danke ich vielmals
für die zahlreichen Anregungen, die wesent-
lich zum Gelingen der Arbeit beigetragen
haben.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0075

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Quantifizierung von DNA in Agarosegelen nach Färbung mit Äthidiumbromid	3
3. Anreicherung von Satelliten-DNA in Chromatin- fraktionen nach Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Restriktionsnukleasen	12
3.1. Chromatinfractionierung nach Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Hae III	12
3.2. Chromatinfractionierung nach Mischspaltung von Mäuseleberzellkernen mit Hae III und Alu	15
4. Charakterisierung des Satelliten-DNA-Chroma- tins im Saccharosegradienten	17
5. Proteinzusammensetzung in Chromatinfractionen nach Hae III-Verdauung von Mäuseleberzellkernen	21
6. Chromatinfractionierung nach Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Sau 96	23
7. Diskussion	26
7.1. Quantitative Bestimmung von DNA im Agarosegel	26
7.2. Anreicherung von Satellitenchromatin durch Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Restriktionsnukleasen	27
8. Materialien und Methoden	30
8.1. Enzyme	30
8.2. Präparation von Zellkernen aus Mäuseleber	30
8.3. Spaltung des Chromatins mit Restriktions- nukleasen und Micrococcus-Nuklease	30
8.4. Extraktion des löslichen Chromatins	31
8.5. DNA-Isolierung aus Chromatinfractionen	31
8.6. Spaltung der DNA mit Eco RII oder Sau 96 zur quantitativen Bestimmung des Satelliten- DNA-Anteils	32
8.7. Agarose-Gelelektrophorese	33

8.8.	Photographie und Densitometrie	34
8.9.	Zentrifugation von Chromatin im Saccharose- gradienten	35
8.10.	Analyse der Histonzusammensetzung durch SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
9.	Zusammenfassung der Ergebnisse	37
10.	Literaturverzeichnis	39
11.	Abkürzungsverzeichnis	41
	Lebenslauf	

1. Einleitung und Problemstellung

Hochrepetitive DNA-Anteile sind in erheblichem Umfang im Genom fast aller Eukaryonten vertreten (Übersicht Ref. 1). Ihr Aufbau ist gekennzeichnet durch die vielfache Wiederholung verhältnismäßig kurzer DNA-Abschnitte. In vielen Fällen ist es möglich, solche repetitiven Komponenten durch Dichtegradientenzentrifugation als sogenannte Satelliten-DNA von der übrigen DNA, die als Hauptbanden-DNA bezeichnet wird, abzutrennen.

Die Funktion der Satelliten-DNA ist unbekannt, sicher ist aber, daß sie nicht die klassische Aufgabe der DNA wahrnimmt, Information für RNA- und Proteinsequenzen zu tragen.

Die DNA der Maus enthält eine Satellitenkomponente von etwa 8%, die schon seit langem durch ihr Verhalten in CsCl-Gradienten (15) und in Renaturisierungskinetiken (33) identifiziert werden konnte. In jüngerer Zeit hat die Analyse mit Restriktionsnukleasen neue Erkenntnisse über den Aufbau dieser Satelliten-DNA ergeben (10, 29, 11). Die Restriktionsnukleasen spalten DNA nur an ganz bestimmten Oligonukleotidsequenzen. In Abhängigkeit davon, ob die Erkennungssequenz einer Restriktionsnuklease in der repetitiven Einheit enthalten ist, wird die Satelliten-DNA entweder praktisch gar nicht oder fast vollständig gespalten (11).

Im Zellkern liegt die DNA nicht in freier Form, sondern im Komplex mit Proteinen und RNA als Chromatin vor. Man weiß, daß die Satelliten-DNA in vielen Fällen im zentromeren Heterochromatin auftritt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es auch in der Interphase kondensiert bleibt und zytologisch identifiziert werden kann.

Die Einfachheit der DNA macht das Heterochromatin zu einem interessanten System, um die Beziehungen zwischen DNA-Sequenz und Chromatinstruktur zu untersuchen (Übersicht Ref. 35). Zur Prä-

paration von Heterochromatinfractionen wird meist die zuerst von Frenster et al. beschriebene Behandlung von Zellkernen mit Ultraschall und anschließender differentieller Zentrifugation benutzt (7). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Methode zu ersetzen, da gezeigt worden ist, daß die Chromosomenstruktur bei der Behandlung mit Ultraschall erhebliche Veränderungen erfährt (21). Stattdessen sollte durch Einsatz von Restriktionsnukleasen DNA im Zellkern in definierter Weise verdaut werden und anschließend eine Fraktionierung über das Löslichkeitsverhalten durchgeführt werden. Nach dem sogenannten "Domänenmodell" des Chromatins sind Chromatinstränge in regelmäßigen Abständen an die Kernmatrix fixiert (2, 13) und lassen sich nur nach vorheriger Spaltung der DNA aus dem Zellkern herauslösen (13). So sollte mit Hilfe von Restriktionsnukleasen, die das Satelliten-DNA enthaltende Chromatin sehr viel seltener als das andere Chromatin spalten, eine Trennung des Heterochromatins vom übrigen Chromatin möglich sein.

2. Quantifizierung von DNA in Agarosegelen nach Färbung mit Äthidiumbromid

Um den Nachweis zu führen, daß in Chromatinfractionen aus Mäuseleber Satelliten-DNA im Vergleich zu dem durchschnittlichen Gehalt von 8% (11) angereichert ist oder in verminderter Menge vorliegt, ist es notwendig, den relativen Anteil an Satelliten-DNA einer DNA-Probe bestimmen zu können. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit durch Spaltung der DNA mit der Restriktionsnuklease Eco RII geschehen. Dabei werden etwa 90% der Satelliten-DNA in Fragmente von 240 Nukleotidpaaren Länge und Vielfachen davon gespalten. 10 - 15% der Satelliten-DNA ergeben zusätzliche Fragmente, deren Größen zwischen denen der Hauptserie liegen (29, 11). Der Rest der DNA, in Anbetracht der Abtrennbarkeit im CsCl-Gradienten auch als Hauptbanden-DNA bezeichnet, ergibt dagegen eine Vielzahl von Fragmenten verschiedener Größe, die sich in der Gelelektrophorese als kontinuierliches Spektrum äußert (24, 9).

Der relative Satelliten-DNA-Anteil läßt sich durch Anfärben der Gele mit Äthidiumbromid, Photographie des fluoreszierenden Gels und Densitometrie des Negatives bestimmen, indem die DNA-Menge der diskreten Banden, die der Satelliten-DNA entsprechen, in Beziehung gesetzt wird zu der DNA-Menge, die den Untergrund im Densitogramm darstellt. Dazu werden die Flächen bestimmt, die die DNA-Anteile im Densitogramm einnehmen.

Bei dem Versuch, den Satelliten-DNA-Gehalt einer unfractionierten Gesamt-DNA zu bestimmen, ergaben sich regelmäßig Werte, die um 50% unter dem bekannten Anteil von 8% lagen, wenn man die entsprechenden Flächen in den Densitogrammen zueinander in Beziehung setzte. Als Ursache dieser Diskrepanz stellte sich heraus, daß bei konstanter Satelliten-DNA-Menge die zugehörigen Flächen in den Densitogrammen nicht immer gleich waren, sondern umso kleiner

wurden, je höher der durch die Nicht-Satelliten-DNA erzeugte Untergrund wurde. Abbildung 1 zeigt, daß es sich dabei um ein Charakteristikum der photographischen Auswertung handelt und nicht um einen Elektrophoreseeffekt. Abbildung 1A entspricht einer Gelbahn, die nur Satelliten-DNA enthält. Wird beim Photographieren künstlich ein Untergrund erzeugt, indem man an der gleichen Stelle zuerst die Bahn mit der Satelliten-DNA und dann eine leere Gelbahn photographiert, so erscheinen die Gipfel der Satelliten-DNA deutlich kleiner (Abbildung 1B).

Damit erwies sich die bisher verwendete Methode der DNA-Quantifizierung durch Densitometrie der Gelnegative als auf das hier vorliegende Problem nicht anwendbar.

Die Erklärung für den beobachteten Effekt liegt in der Natur des photographischen Prozesses. Die Intensität der Fluoreszenz (I) sollte proportional der Konzentration der DNA im Gel (c) sein. Also

$$I \sim c \quad (i)$$

Die Beziehung zwischen Filmschwärzung (E) und Lichtintensität (I) ist in untenstehender Abbildung dargestellt. Es ist ersichtlich, daß folgende Beziehung besteht:

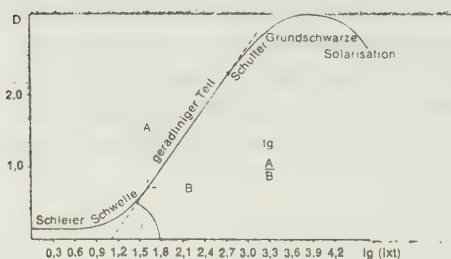
$$E \sim \gamma \cdot \log(I \cdot t) \quad (ii)$$

oder, bei konstanter Belichtungszeit:

$$I \sim 10^{E/\gamma} \quad (iii)$$

Damit ergibt sich bei konstanter Belichtungszeit aus (i) und (iii):

$$c \sim 10^{E/\gamma} \quad (iv)$$



Charakteristische Dichtekurve eines photographischen Materiales (aus Ref. 36)

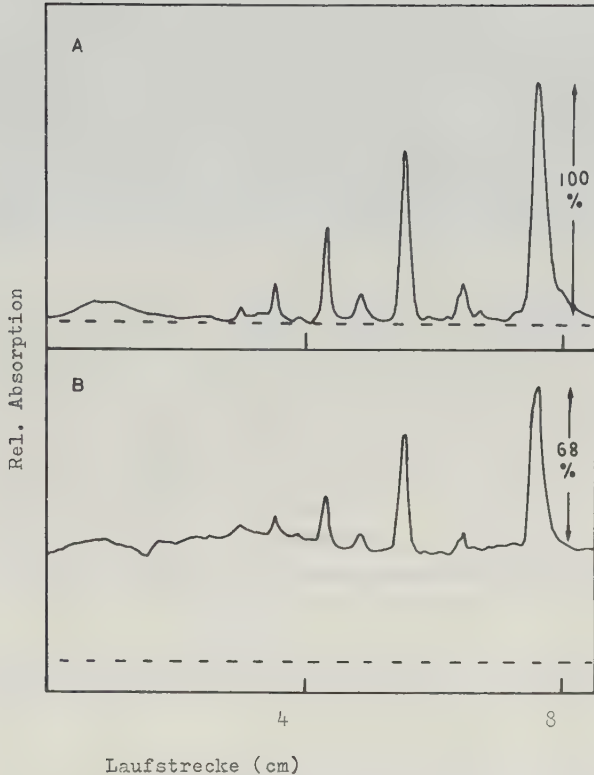


Abb. 1 : DNA-Quantifizierung in äthidiumbromidgefärbten Agarosegeln

0,5 µg reine Satelliten-DNA wurden mit Eco RII gespalten und auf einem 1,8% Agarosegel analysiert. Die Gelbahn mit den Satellitenspaltstücken wurde ausgeschnitten und im UV-Durchlicht bei seitlicher Abdeckung (um Streulicht zu vermeiden) 30 Sek. photographiert. Das Negativ wurde 2,5 Min. bei 22°C entwickelt und die Satellitenbahn densitometriert, wobei die Extinktion (E) gemessen wurde (A). Die Fläche des Monomergipfels wurde in A mit 100% bezeichnet. Die gestrichelte Linie zeigt die Extinktion des DNA-freien Gelhintergrundes (gleiche Belichtung und Entwicklung wie oben). Für B wurde das Filmmaterial zweimal

belichtet, zunächst mit der Gelbahn wie in A, danach zusätzlich mit der Fluoreszenz einer DNA-freien Gelbahn (ebenfalls 30 Sek.), so daß sich im Negativ Satellitenbahn und leere Bahn überlagerten. Entwicklung und Densitometrie wurden wie für A angegeben durchgeführt. Die Fläche des Monomergipfels beträgt relativ zur Fläche in A hier 68%. Die gestrichelte Linie zeigt wiederum die Extinktion des DNA-freien Gelhintergrundes und entspricht der in A, also ohne Berücksichtigung der zweiten Belichtung.

Aus dieser Beziehung folgt unmittelbar, daß in Abbildung 1 A und B nicht die Gipfelflächen, also $E \cdot \text{Wegstrecke}$ verglichen werden dürfen, sondern $10^{E/\chi}$. Wegstrecke. Dazu kann man behelfsweise jeden Gipfel in einzelne Rechtecke unterteilen und für jeden dieser Rechteckpeaks den Wert $10^{E/\chi}$ errechnen. Einfacher ist es, im Densitogramm statt der Extinktion E direkt $10^{E/\chi}$ aufzuzeichnen. In jedem Fall muß zunächst χ bestimmt werden. Das geschah mit Hilfe eines Graukeils mit 14 Grauwerten, die stufenweise immer um 0,2 Extinktionseinheiten zunehmen. Beim Photographieren erhält man ein Negativ des Keils, dessen Extinktionsstufen sich im Densitometer bestimmen lassen. Aus dem Anstieg der Extinktion von Stufe zu Stufe im Vergleich zum Original-Keil läßt sich der χ -Wert bestimmen. Er ist ein Charakteristikum des Films und hängt nur von den Entwicklungsbedingungen ab.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse, die mit dem hier verwendeten Film erzielt wurden. Der χ -Wert variiert zwischen etwa 0,8 und 1,3. Außerdem ist zu beachten, daß der lineare Teil der Filmschwärzungskurve erst bei $E = 0,4$ beginnt. Dieser Sachverhalt ist für die Auswertung sehr wichtig, denn die quantitative Analyse kann nur dann durchgeführt werden, wenn die Grundlinie im Densitogramm mindestens die Extinktion von 0,4 gegenüber unbelichtetem Film aufweist. Dies entspricht bei unseren Bedingungen im allgemeinen der Grundschrwärzung der mit Athidiumbromid gefärbten Gele (Agarosegel ohne DNA), so daß keine zusätzlichen Vorkehrungen für die Auswertung zu treffen sind.

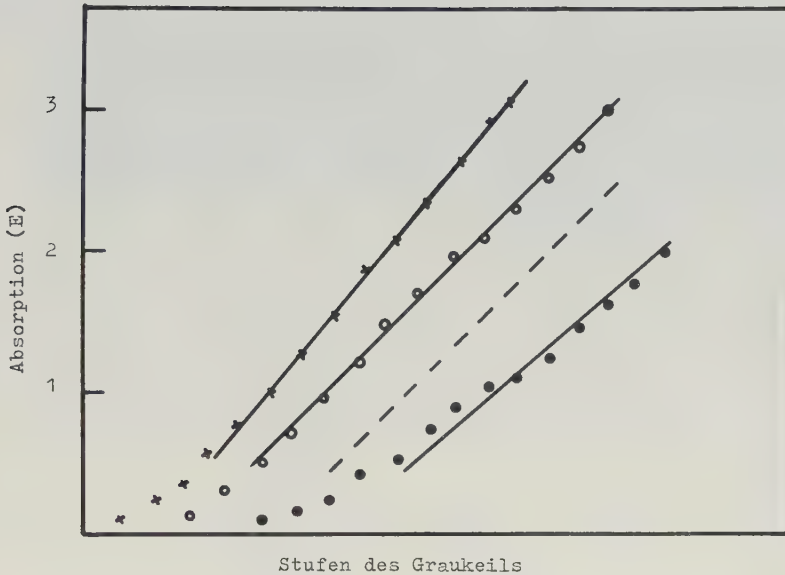


Abb. 2: Schwärzungskurve des für die Photographie verwendeten Films

Ein Graukeil wurde auf einer Fluoreszenzfolie befestigt und im UV-Durchlicht photographiert. Um Streulicht zu vermeiden, wurde die UV-Lichtquelle neben dem Graukeil abgedeckt. Sowohl das Negativ als auch der Original-Graukeil wurden densitometriert (Messung der Extinktion E) und die Schwärzungskurven des Negativs gegen die Stufen des Original-Graukeils aufgetragen. Die Steigung der Gerade (γ) im linearen Teil der Schwärzungskurve kennzeichnet die Gradation des Negativs.

- x-x: Belichtung 0,5 Sek., Blende 11, Entwicklung 4,5 Min. bei 26°C ; $\gamma = 1,27$
- o-o: Belichtung 3 Sek., Blende 11, Entwicklung 4,5 Min. bei 22°C ; $\gamma = 1,0$
- : Belichtung 3 Sek., Blende 11, Entwicklung 2,5 Min. bei 25°C ; $\gamma = 0,87$
- -: Kurve für $\gamma = 1,0$

Mit Unterstützung der Elektronikwerkstatt des SFB 51 wurde dann ein Gerät konstruiert, das die Extinktionswerte E in $10^{E/\gamma}$ um-

wandelt. Über einen Regelknopf läßt sich γ von 0,000 bis 2,000 einstellen. Dieses Gerät wurde zwischen Densitometer und Schreiber geschaltet. Abbildung 3 zeigt das mit Hilfe dieses Gerätes exponentiell densitometrierte Negativ im Unterschied zur linearen Densitometrie in Abbildung 1. Daraus ist zu ersehen, daß nun die Gipfel des Satelliten-DNA-Anteils in Abbildung A und B flächenmäßig gleich groß sind.

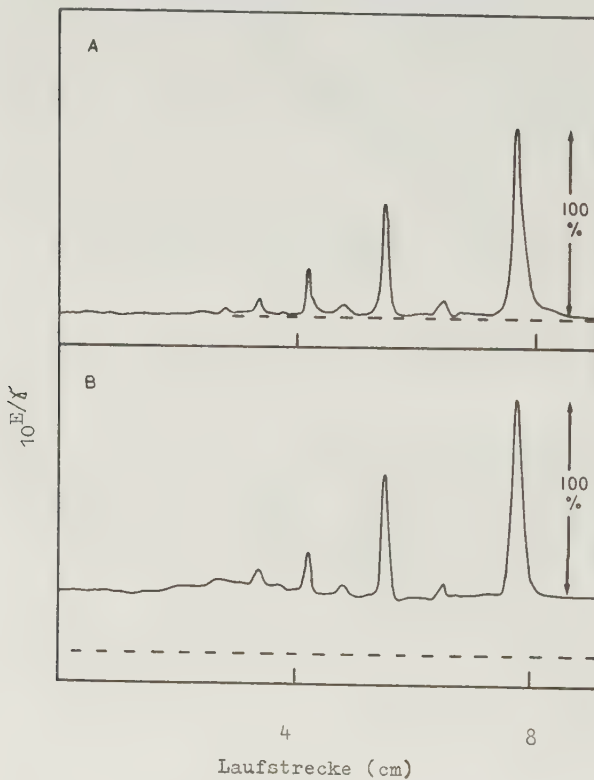


Abb. 3: Exponentielle Densitometrie der Negative zur quantitativen DNA-Bestimmung aus äthidiumbromidgefärbten Agarosegelen

Die selben Negative wie in Abb. 1 A und B wurden densitometriert, jedoch an Stelle von E die Werte $10^{E/\lambda}$ bestimmt ("exponentielle Densitometrie").

Die Flächen der monomeren Satelliten-DNA-Fragmente sind für A und B jetzt gleich (in der Abb. mit 100% bezeichnet). λ wurde bestimmt, wie in Kap. 2 und Abb. 2 beschrieben. Die gestrichelte Linie in A und B entspricht der in Abb. 1 A und B und kennzeichnet die Extinktion des DNA-freien Gelhintergrundes.

Abbildung 4 zeigt am Beispiel einer mit Eco RII gespaltenen Gesamt-DNA aus Mäuseleberzellkernen den Unterschied zwischen linearer und exponentieller Densitometrie. Das Auswerten der Gipfelflächen von Satelliten-DNA ergibt einen Anteil von 7,93%, gemäß dem in der Literatur genannten Wert von 8%.

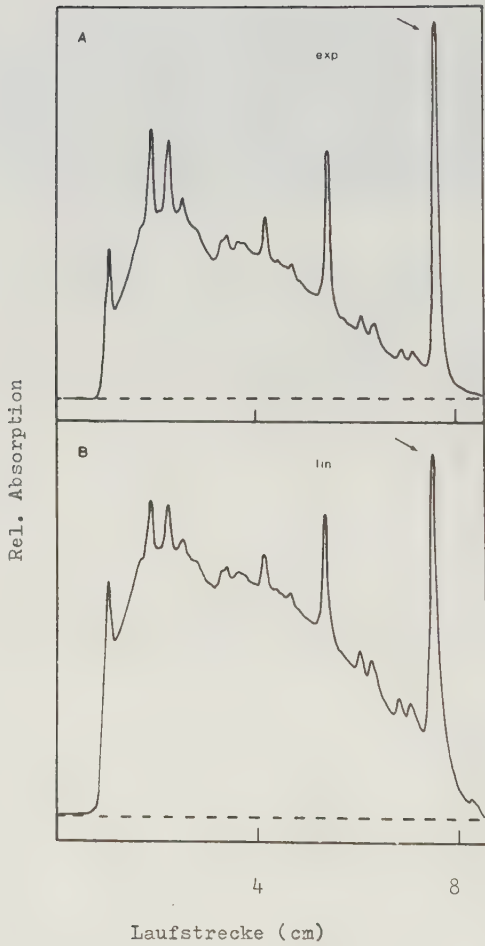


Abb. 4: Bestimmung des Satelliten-DNA-Anteils in Mäuse-DNA durch Spaltung mit Eco RII und Elektrophorese im Agarosegel

5 µg Mäuse-Gesamt-DNA wurden mit Eco RII gespalten und auf einem 1,8% Agarosegel analysiert. Das Gel wurde 60 Sek. im UV-Durchlicht photographiert und das Negativ 2,5 Min. bei 22°C entwickelt und densitometriert. Im Densitogramm A wurde $10^{E/\lambda}$ aufgetragen, im Densitogramm B E. Die Pfeile zeigen auf das Monomer der Satelliten-DNA. Die gestrichelte Linie bezeichnet die Extinktion des DNA-freien Gelhintergrundes.

3. Anreicherung von Satelliten-DNA in Chromatinfractionen nach Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Restriktionsnukleasen

Es sollten zunächst Restriktionsnukleasen zur Anwendung kommen, die die Satelliten-DNA nicht oder nur in geringem Umfang spalten (Typ-B-Muster, vgl. Ref. 11), in den Rest der DNA (Hauptbanden-DNA) dagegen eine möglichst große Anzahl von Brüchen einführen. In den nachfolgenden Solubilisierungsschritten des Chromatins sollte das auf Grund der unterschiedlichen DNA-Größen zu einer Anreicherung der Satelliten-DNA führen (13). Für diese Versuche eignen sich insbesondere Restriktionsnukleasen mit kurzen Erkennungssequenzen (Tetranukleotide) wie Hae III (GGCC), Alu (AGCT) oder Sau 3A (GATC). Letztgenanntes Enzym ergibt ebenfalls ein Typ-B-Spaltmuster mit Mäuse-Satelliten-DNA (W. Hörz, unveröffentlicht). Zum anderen sollte versucht werden, nach Spaltung mit Nukleasen, die die Satelliten-DNA in regelmäßigen Abständen spalten, also ein Typ-A-Muster ergeben (11), Chromatinfractionen zu erhalten und sie auf ihren Gehalt an Satelliten-DNA zu analysieren. In diese Gruppe von Restriktionsnukleasen gehören Eco RII (11) und Sau 96 (W. Hörz, unveröffentlicht; vgl. auch Ref. 5).

3.1. Chromatinfractionierung nach Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Hae III

Mäuseleberzellkerne wurden mit Hae III gespalten, dabei wurden die Bedingungen so gewählt, daß die Verdauung einen Plateauwert erreichte (9). Nach dem Ende der Verdauung wurden die Kerne abzentrifugiert und das Kernmaterial bei sehr niedriger Ionenstärke extrahiert. Etwa 70% des Gesamtchromatins gingen dabei

in Lösung. Abbildung 5 (a-c) zeigt eine gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus dem gesamten Kernmaterial sowie aus dem unlöslichen und dem löslichen Anteil. Im Einklang mit ähnlichen Versuchen im Rattenlebersystem zeigte sich kein erheblicher Unterschied in der Größenverteilung in den beiden Fraktionen (12, 13). Zur Bestimmung des Satelliten-DNA-Anteils wurde DNA aus der löslichen sowie aus der unlöslichen Chromatinfraction mit Eco RII gespalten. Abbildung 5 zeigt, daß die DNA aus der löslichen Fraction die für Satelliten-DNA charakteristischen Banden des 240-Nukleotidpaar-Rasters nur ganz schwach zeigt. Dagegen erscheinen die Banden aus der unlöslichen Fraction deutlich angereichert relativ zur unfraktionierten Gesamt-DNA (Abb. 5d). Die quantitative Auswertung der Gele ergab einen Anteil von 30% Satelliten-DNA in der unlöslichen Fraction gegenüber 1 - 2% in der löslichen. Für die unfraktionierte Gesamt-DNA wurden 7 - 8% ermittelt. Daraus geht hervor, daß sich unter den Versuchsbedingungen offensichtlich fast die gesamte Satelliten-DNA im unlöslichen Anteil befindet.

Bei Verdauung mit niedrigeren Hae III-Konzentrationen sinkt der Anteil des Chromatins, das in Lösung geht und entsprechend der relative Satelliten-DNA-Anteil im unlöslichen Chromatin. Der Grad der Anreicherung von Satelliten-DNA im unlöslichen Chromatin ist begrenzt durch den Plateauwert von 70 - 80% für lösliches Chromatin, der bei der Verdauung mit Hae III auch bei längerer Einwirkungsdauer oder höherer Hae III-Konzentration nicht überschritten werden konnte. Der Sachverhalt steht in Einklang mit theoretischen Überlegungen, die für das analoge Rattenlebersystem gewonnen wurden (13).

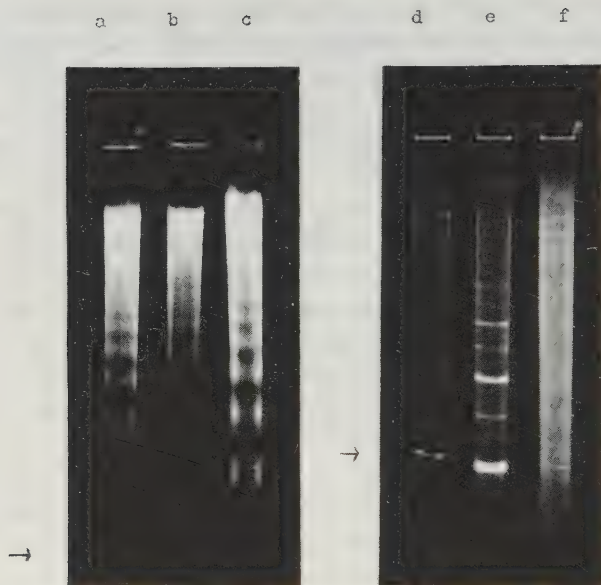


Abb. 5: Analyse der DNA nach Abbau von Mäuseleberzellkernen
mit Hae III

Mäuseleberzellkerne mit je 300 μ g DNA wurden mit 10^4 U/ml Hae III 2,5 Std. inkubiert und die Fraktionierung in den löslichen und den unlöslichen Chromatinanteil durchgeführt. Nach der Proteinverdauung wurde die DNA auf einem 1,5% (a - c) bzw. 2% (d - f) Agarosegel analysiert. a: Gesamt-DNA, nicht fraktioniert; b: DNA im unlöslichen Anteil; c: DNA im löslichen Anteil. In d - f sind in der gleichen Reihenfolge die Proben nach Spaltung mit Eco RII zur Analyse des Satelliten-DNA-Gehaltes gezeigt (vgl. Kap. 8.6). Der Pfeil neben Bahn a bezeichnet DNA von ungefähr 200 bp Größe, der neben Bahn d das Eco RII-Monomer der Satelliten-DNA von 240 bp Größe.

3.2. Chromatinfractionierung nach Mischspaltung von Mäuseleberzellkernen mit Hae III und Alu

Um eine stärkere Anreicherung der Satelliten-DNA im unlöslichen Chromatin zu erzielen als mit Hae III erreichbar war, sollte versucht werden, durch Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit einer weiteren Typ-B-Nuklease im Anschluß an die Spaltung mit Hae III den löslichen, nahezu Satelliten-DNA-freien Anteil zu Lasten des unlöslichen, Satelliten-DNA-haltigen zu vergrößern. Als zusätzliche Nuklease wurde in unserem Versuch die Restriktionsnuklease Alu eingesetzt,

Zunächst wurde gezeigt, daß eine Chromatinverdauung mit Alu alleine bei der Analyse der unlöslichen Fraktion ein ähnliches Bild ergibt wie die Verdauung mit Hae III alleine. In beiden Fällen beträgt der Anteil der unlöslichen Chromatinfraction etwa 20 - 30% und die quantitative Auswertung zeigt einen Gehalt an Satelliten-DNA von jeweils etwa 30%.

Das Bild ändert sich nur geringfügig, wenn man das Ergebnis der Mischspaltung betrachtet (Abb. 6). Offensichtlich steigt der lösliche Chromatinanteil nicht mehr nennenswert an, obwohl die DNA-Größenverteilung in der Mischspaltung zu niedrigeren Molekulargewichten verschoben ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Mischverdauungen mit anderen Restriktionsnukleasen (Sau 3A, Hinf I) erzielt. In keinem Fall war es möglich, den Anteil des löslichen Chromatins nennenswert zu steigern. Entsprechend blieb der Satelliten-DNA-Anteil im unlöslichen Chromatin bei etwa 30%.

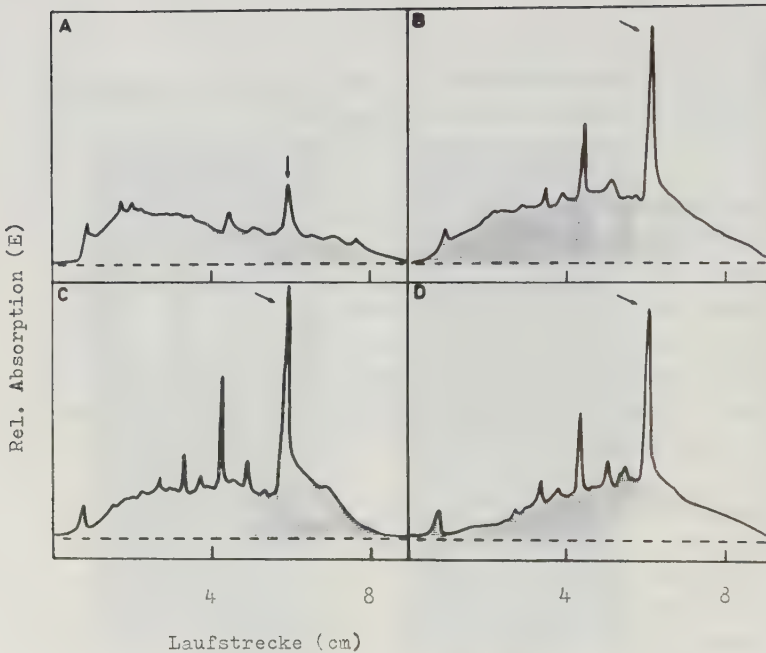


Abb. 6: Analyse der DNA nach Mischspaltung von Mäuseleberzellkernen mit Hae III und Alu

Mäuseleberzellkerne wurden mit 10^4 U/ml Hae III (B) bzw. mit 2700 U/ml Alu (C) 2 Std. gespalten. Ein Teil der mit Hae III verdauten Kerne wurde schonend abzentrifugiert, zweimal mit dem Spaltpuffer gewaschen und anschließend mit 2700 U/ml Alu gespalten (D). Die DNA wurde jeweils aus dem unlöslichen Anteil isoliert und durch Spaltung mit Eco RII auf ihren Gehalt an Satelliten-DNA analysiert. Gezeigt sind Densitogramme der Kernspaltungen mit Hae III (B), mit Alu (C), mit Hae III und Alu (D). Der Anteil an Satelliten-DNA betrug in B, C und D jeweils etwa 30% (vgl. Text). A zeigt zum Vergleich eine Eco RII-Spaltung von DNA aus unfraktioniertem Gesamtchromatin (Satelliten-DNA-Anteil hier etwa 8%). Bei der Densitometrie wurde die Extinktion E gemessen. Die punktierte Fläche stellt den Anteil an Nicht-Satelliten-DNA dar. Die gestrichelte Linie entspricht der Absorption einer DNA-freien Gelbahn. Die Pfeile deuten auf das Eco RII-Monomer der Satelliten-DNA.

4. Charakterisierung des Satelliten-DNA-Chromatins im Saccharosegradienten

Nach Hae-III-Verdauung sollte die Satelliten-DNA im unlöslichen Chromatin in hochmolekularer Form vorliegen, während die darin noch enthaltene Hauptbanden-DNA auf Grund der vielen Brüche eine sehr breite Größenverteilung aufweisen müßte (Abb. 5; 24, 9, 13), die in erster Näherung eine statistische Verteilung von Hae-III-Spaltstellen widerspiegelt.

Die Größenunterschiede sollten eine weitere Anreicherung des Satellitenchromatins über direkte Auftrennung des Chromatins nach Größe erlauben, wie etwa durch Zentrifugation im Saccharosegradienten. Für dieses Verfahren muß allerdings das Chromatin erst in Lösung gebracht werden. Dies wäre zum Beispiel mit NaCl in Konzentration von etwa 0,6 M möglich (12), andererseits wird dabei das Histon H_1 entfernt und das verbleibende H_1 -freie Chromatin scheint dabei Veränderungen zu erfahren (30).

Deshalb wurde die schonende Behandlung des unlöslichen Chromatins mit Nukleasen als alternative Methode gewählt. Dabei ergibt sich allerdings die Schwierigkeit, einerseits die Enzymkonzentration so hoch zu wählen, daß genügend Material in Lösung geht und andererseits so niedrig, daß die Größenunterschiede zwischen Satelliten- und Hauptbanden-DNA im Chromatin nicht zu sehr verwischt werden. Vorversuche ergaben, daß sich sowohl Micrococcus-Nuklease, also eine unspezifische Nuklease, als auch Eco RII für diesen Zweck eigneten.

Bei Inkubation von unlöslichem Chromatin mit Micrococcus-Nuklease gingen unter unseren Bedingungen 50% des Materials in Lösung, bei Spaltung mit Eco RII waren es 25%.

Abbildung 7 zeigt die Auftrennung solcher Chromatinfractionen im Saccharosegradienten.

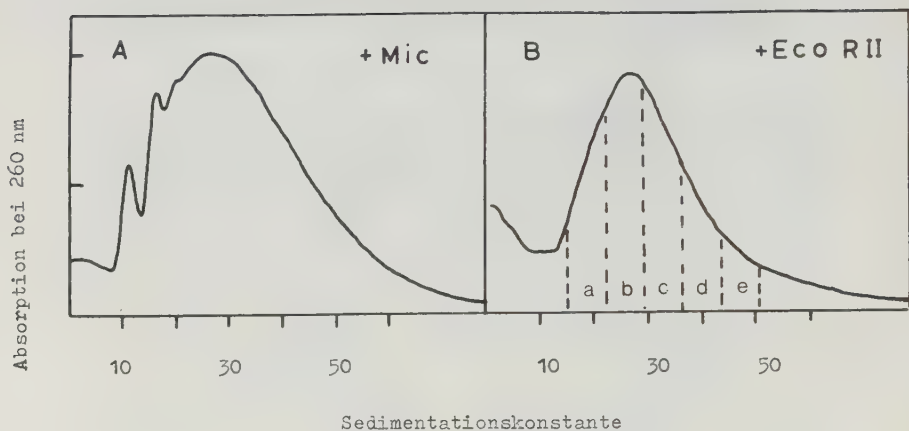


Abb. 7: Auftrennung von Satelliten-DNA enthaltenden Chromatinfraktionen im Saccharosegradienten

Mäuseleberzellkerne wurden 2,5 Std. mit 10^4 U/ml Hae III gespalten. Nach Extraktion des löslichen Anteils verblieben 40% der DNA in der unlöslichen Fraktion.

Das Chromatin dieser Fraktion wurde anschließend entweder mit Micrococcus-Nuklease (A) oder Eco RII (B) verdaut. Für die Verdauung wurde das unlösliche Material in 0,2 mM EDTA / 0,5 mM Tris-HCl, pH 7,4 verteilt und bei einer DNA-Konzentration von 1,9 mg/ml mit 15 U/ml Micrococcus-Nuklease 8 Min. bei 37°C verdaut (siehe Kap. 8.3) und solubilisiert. Bei diesem Vorgehen gingen 50% des vorher unlöslichen Materials in Lösung.

Zur Verdauung mit Eco RII wurde unlösliches Material ebenfalls in 0,2 mM EDTA / 0,5 mM Tris-HCl, pH 7,4 verteilt und anschließend bei einer DNA-Konzentration von 1 mg/ml mit 6000 U/ml Eco RII 2 Std. bei 37°C verdaut (siehe Kap. 8.3) und solubilisiert. Auf diese Weise ließen sich 25% des vorher unlöslichen Materials solubilisieren.

2,4 A-260-Einheiten des mit Micrococcus-Nuklease solubilisierten Materials und 1,9 A-260-Einheiten des mit Eco RII solubilisierten Materials wurden auf Saccharosegradienten aufgetragen, die 0,5 mM Tris-HCl, pH 8 und 0,2 mM EDTA enthielten. Die Zentrifugation wurde 3,5 Std. bei 40000 U/min. und 4°C in der Beckman-Ultrazentrifuge mit dem SW 41-Rotor durchgeführt. A zeigt das Profil des nach Verdauung mit Micrococcus-Nuklease solubilisierten Chromatins, B das Profil für Eco RII.

Das Sedimentationsverhalten ist nach der Behandlung mit Micrococcus-Nuklease bzw. Eco RII ähnlich. Ein charakteristischer Unterschied besteht jedoch im relativ höheren Anteil an Mononukleosomen und Dinukleosomen im Fall der Solubilisierung mit Micrococcus-Nuklease. Das mit Eco RII behandelte Chromatin wurde nach der Zentrifugation im Saccharosegradienten auf seinen DNA-Gehalt untersucht und die DNA außerdem zur Bestimmung des relativen Satellitenanteils mit Eco RII zu Ende gespalten.

Die DNA-Analyse zeigt wie erwartet, daß die schneller sedimentierenden Chromatinfractionen größere DNA enthalten als die langsamer sedimentierenden (Abb. 8 f - k). Außerdem sind diskrete Banden im 240-Nukleotidpaar-Register zu sehen. Dabei handelt es sich um Fragmente der Satelliten-DNA, die bei der Spaltung mit Eco RII entstanden sind.

Die vollständige Spaltung der isolierten DNA mit Eco RII zeigt deutlich, daß die Satelliten-DNA in den schnell sedimentierenden Fraktionen gegenüber den langsam sedimentierenden angereichert ist.

Die quantitative Analyse ergab für die Fraktionen b - e Anteile an Satelliten-DNA von 2,6 - 4,1 - 6,9 und 15%. Im Ausgangsmaterial für den Gradienten betrug der Satelliten-DNA-Gehalt 15%.

Daraus muß geschlossen werden, daß bei der Solubilisierung mit Eco RII relativ mehr Nicht-Satelliten-DNA-Chromatin als Satelliten-DNA-Chromatin in Lösung gegangen ist (Abnahme von 30% auf 15%). Die Abreicherung der Satelliten-DNA in den langsamer sedimentierenden Fraktionen relativ zum Ausgangsmaterial könnte eine Erklärung darin haben, daß sich in den nicht analysierten Fraktionen nahe am Boden oder möglicherweise am Boden des Zentrifugenröhrchens noch Chromatin mit relativ hohem Gehalt an Satelliten-DNA befindet. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Analyse des durch Micrococcus-Nuklease in Lösung gebrachten Chromatins. Da jedoch diese unspezifische Nuklease die Satelliten-DNA nicht im 240-Nukleotidpaar-Register spaltet, wurden diese Versuche nicht weiter

verfolgt, denn der Satelliten-DNA-Gehalt insbesondere in Fraktionen mit kleiner DNA wäre nicht mehr quantifizierbar gewesen.

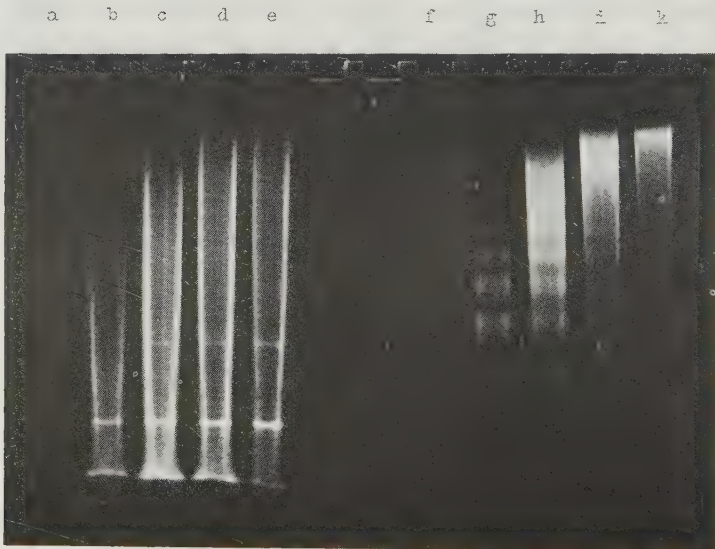


Abb. 8: Analyse der DNA des mit Eco RII solubilisierten und im Saccharosegradienten fraktionierten Chromatins aus Abb. 7B

Aus den Fraktionen des Saccharosegradienten von Abb. 7B wurde die DNA isoliert und durch Spaltung mit Eco RII auf den Satelliten-DNA-Gehalt analysiert. Die Bahnen a - e zeigen die DNA der in Abb. 7B entsprechend gekennzeichneten Fraktionen nach der Spaltung mit Eco RII auf einem 1,8% Agarosegel, die Bahnen f - k zeigen die entsprechende DNA direkt aus den Gradientenfraktionen ohne Spaltung mit Eco RII.

5. Proteinzusammensetzung in Chromatinfractionen nach Hae III-Verdauung von Mäuseleberzellkernen

Die Integrität der Histone nach Verdauung von Chromatin mit Restriktionsnukleasen konnte bereits gezeigt werden (9, 12).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Histonzusammensetzung der löslichen Chromatinfractionen mit der der unlöslichen verglichen werden.

Nachdem eine weitere Anreicherung des Satelliten-Chromatins bisher nicht gelungen war, wurde direkt die Proteinzusammensetzung des löslichen und unlöslichen Anteils nach Hae III-Spaltung von Mäuseleberzellkernen verglichen. Die Analyse im SDS-Gel gab keinen Hinweis auf Unterschiede in der Histonzusammensetzung beider Fraktionen (Abb. 9). Die Densitometrie des Gels wies gleiche Mengenverhältnisse sowohl der vier Kernhistone als auch der drei Banden im H_1 -Bereich auf.

Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß das unlösliche Chromatin nur 30% Satelliten-DNA-Anteil enthielt und somit allenfalls eine Abweichung von etwa 30% in der Histonzusammensetzung zu erwarten gewesen wäre. Aus diesem Grund wurde im gegenwärtigen Stadium darauf verzichtet, in anderen Gel-systemen mögliche Unterschiede in Histonmodifikationen zu prüfen. Der hohe Anteil an Nicht-Histon-Proteinen im unlöslichen Chromatin dürfte weniger als Bestandteil des Satelliten-DNA-Chromatins als vielmehr als Folge einer (zufälligen) Kofraktionierung bei der Extraktion des gespaltenen Kernmaterials mit Puffern niedriger Ionenstärke zu denken sein.



Abb. 9: Proteinzusammensetzung in löslichen und unlöslichen Chromatinfractionen nach Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Hae III

Jeweils die Menge an löslichem bzw. unlöslichem Chromatin, die 50 μ g DNA enthielt, wurde auf ihre Proteinzusammensetzung in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel untersucht (siehe Kap. 8.10). Die linke Bahn der Abb. zeigt das unlösliche, die rechte das lösliche Chromatin. Die relative Histonzusammensetzung wurde durch Densitometrie analysiert. Dabei wurden die Banden als Gipfel dargestellt und deren Fläche ausgemessen. Der Anteil des Histon H_1 an der Gesamtfläche aller Histone betrug bei unlöslichem Chromatin ebenso wie bei löslichem Chromatin 15%. Auch die relativen Anteile der H_1 -Subfraktionen waren in beiden Bahnen identisch.

6. Chromatinfractionierung nach Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Sau 96

Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Eco RII hatte ergeben, daß auch die Satelliten-DNA im Kern für diese Restriktionsnuklease zugänglich ist (24) und aus der Analyse der DNA nach der Spaltung konnte geschlossen werden, daß die Satelliten-DNA in einer Nukleosomenstruktur vorliegt (9). Diese Versuche waren deshalb möglich, weil auf der Satelliten-DNA Spaltstellen in regelmäßigem Abstand von 240 Nukleotidpaaren vorkommen (29, 11).

Es sollte nun untersucht werden, wie sich das Satelliten-DNA enthaltende Chromatin solchermaßen gespaltener Kerne in der anschließenden Fraktionierung verhält. Für diese Versuche bot sich außer Eco RII auch das Restriktionsenzym Sau 96 an, das Satelliten-DNA ähnlich wie Eco RII spaltet (W. Hörz, unveröffentlicht, 5).

Das Löslichkeitsverhalten bei der Spaltung der Kerne in Abhängigkeit von der Nukleasekonzentration ist in folgender Tabelle dargestellt:

Sau 96-Konzentr. Einh./ml	Lösl. Chromat.- Anteil %	Sat.-DNA im lösl. Anteil %	unlös. Chromat.- Anteil %	Sat.-DNA im unlös. Anteil %
2000	27	17,3	73	8,7
4000	34	12,4	66	8
8000	54	10,5	46	9,7
16000	70	8,2	30	4,9

Abb. 10 (a, b, d, e) zeigt die Analyse der DNA nach Chromatinspaltung mit Sau 96.

Quantitative Auswertung der Gele ergibt die Werte für den Satelliten-DNA-Gehalt wie sie in der Tabelle angegeben sind. Es ist zu ersehen, daß bei niedriger Sau 96-Konzentration präferentiell Satelliten-DNA enthaltendes Chromatin in Lösung geht. Wie man erwarten würde, gleicht sich bei höheren Sau 96-Konzentrationen die Zusammensetzung des löslichen Chromatins der des Gesamt-Chromatins an. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß sich die Zugänglichkeit des Satelliten-Chromatins für Sau 96 kaum von der des anderen Chromatins unterscheidet. Dadurch kommt die bei limitierenden Nukleasekonzentrationen relativ größere Häufigkeit an Sau 96-Spaltstellen auf der Satelliten-DNA zum Tragen und führt zu einer präferentiellen Solubilisierung von Satelliten-Chromatin.

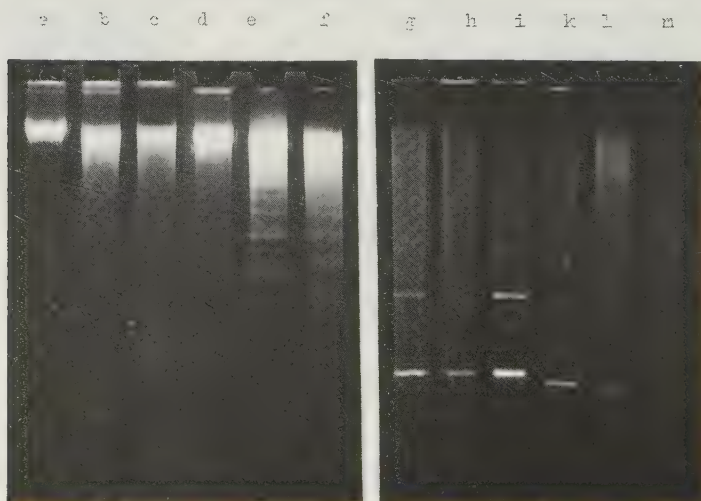


Abb. 10: Analyse der DNA nach Abbau von Mäuseleberzellkernen mit Sau 96

Mäuseleberzellkerne mit je 250 µg DNA wurden mit 2000 bzw. 6000 U/ml Sau 96 2,5 Std. bei 37°C gespalten und das lösliche Chromatin extrahiert. Aus der löslichen bzw. unlöslichen Fraktion wurden je 2,5 µg DNA auf einem 1,8% Agarosegel analysiert. (a: DNA aus der unlöslichen Fraktion nach Spaltung der Kerne mit 2000 U/ml Sau 96; b: desgleichen mit 6000 U/ml; d und e zeigen die DNA der entsprechenden löslichen Fraktionen. Zum Vergleich zeigt c die DNA der unlöslichen Fraktion nach 2,5 Std. Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit 10⁴ U/ml Hae III, f die DNA aus der entsprechenden löslichen Fraktion). Zur Analyse des Satelliten-DNA-Anteils wurden je 5 µg DNA aus den oben erwähnten Proben mit 3200 U/ml Sau 96 gespalten und auf ein 1,8% Agarosegel aufgebracht. Die Bahnen g - m zeigen das Ergebnis dieser Spaltung in gleicher Reihenfolge wie die Bahnen a - f.

7. Diskussion

7.1. Quantitative Bestimmung von DNA im Agarosegel

Eine wesentliche Voraussetzung für die Bestimmung der Anreicherung von Satellitenchromatinfractionen ist eine quantitative Auswertungsmethode für Satelliten-DNA. Der Gehalt an Satelliten-DNA sollte durch Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen und Quantifizierung der bekannten Satelliten-DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese ermittelt werden. Die herkömmliche Methode, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Gel zu photographieren und das Negativ zu densitometrieren, erwies sich jedoch für die vorliegende Fragestellung als nicht anwendbar. Der Anteil an Satelliten-DNA einer DNA-Probe wurde regelmäßig als sehr viel zu niedrig ermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß die Ursache dieses Problems in der photographischen Auswertung der Gele zu suchen war. Die Schwärzung des Negativs ist dabei nicht direkt proportional der DNA-Menge auf dem Gel, sondern proportional dem Logarithmus der DNA-Menge. Um diesem Problem Rechnung zu tragen, wurde eine Methode entwickelt, bei der Densitometrie der Negative nicht die Extinktion E zu bestimmen, sondern direkt den Wert 10^E abzuleiten. Dabei muß zusätzlich noch die Schwärzungscharakteristik des Filmes berücksichtigt werden. Zu dem gleichen Schluß waren Prunell et al. (25) und Pulleyblank et al. (26) gekommen, hatten allerdings als Ausweg herkömmliche Densitogramme über einen angeschlossenen Computer umgerechnet und ausgewertet. Da für kleine Werte von E gilt: 10^E proportional E , wirkt sich dieses Problem bei der Auswertung in den meisten Fällen nicht stark aus. Beim Vergleich der sehr hohen Extinktion einer Satelliten-DNA-Bande mit der niedrigen der gleichzeitig kontinuierlich verteilten Nicht-Satelliten-DNA ist diese Annäherung dagegen nicht mehr zulässig.

7.2. Anreicherung von Satellitenchromatin durch Spaltung von Mäuseleberzellkernen mit Restriktionsnukleasen.

Das Konzept der Darstellung von Satellitenchromatin durch Spaltung von Zellkernen mit Restriktionsnukleasen und anschließender Fraktionierung in einen löslichen und einen unlöslichen Chromatinanteil hat sich als richtig herausgestellt. Es beruht auf der Vorstellung, daß Chromatinstränge im Zellkern in regelmäßigen Abständen an eine feste Kernmatrix gebunden sind. Dieses sogenannte Domänenmodell stützt sich auf Untersuchungen an Interphasenchromatin (2, 4, 20) und Metaphasenchromatin (22) und wurde in diesem Labor aus einer detaillierten Analyse der Spaltung von Chromatin durch Nukleasen entwickelt (13).

Chromatinfractionen, die sehr selten gespalten werden, sollten sich nach diesem Modell in unlöslichen Fraktionen anreichern, solche, die überdurchschnittlich häufig gespalten werden, in löslichen Fraktionen, da sie weitgehend von der Matrix abgetrennt werden.

In dieser Weise sind selten gespaltene Satellitenchromatin-Fractionen aus Mäusekernen mit Eco RI (3) und weit abgebaute Fractionen aus Kalbsthymus (17), grünen Meerkatzenzellen (19) und Rattenleber (12) mit Eco RI angereichert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Restriktionsnukleasen verwendet, die Mäuse-Satelliten-DNA selten spalten, als auch Restriktionsnukleasen, die häufig spalten (29, 11). Mit der Nuklease Hae III gelang es, etwa 60 - 80% des Chromatins zu solubilisieren, dabei aber das Satelliten-DNA enthaltende Chromatin fast quantitativ in der unlöslichen Fraktion zu erhalten. Hae III spaltet die Nicht-Satelliten-DNA in Mäusezellen (Hauptbanden-DNA) im Durchschnitt alle 500 bp, während 90% der Satelliten-DNA nicht gespalten werden (29, 11).

Die Versuche, die Anreicherung des Satellitenchromatins noch zu erhöhen, erwiesen sich als unerwartet schwierig. Es wurden zunächst Doppelspaltungen mit Hae III und Alu, einer Restriktionsnuklease, die die Mäuse-Satelliten-DNA in ähnlicher Weise wie Hae III spaltet, ausgeführt. Dabei werden noch mehr Brüche in die Hauptbanden-DNA eingeführt, und so sollte sich der Anteil an löslichem Chromatin erhöhen. Dies war aber nicht der Fall. Zwar nahm die Größe der Hauptbanden-DNA deutlich ab, aber es blieben nach wie vor etwa 20 - 40% der DNA in der unlöslichen Fraktion. Dies könnte seinen Grund in sekundären Aggregations-effekten haben, die bei den Verdauungsexperimenten möglicherweise auftreten und vielleicht die Löslichkeit des Chromatins beeinträchtigen, auch wenn es nicht mehr über die DNA an die Matrix gebunden ist. Denkbar ist auch, daß die hypothetischen Anheftungsstellen nicht punktförmig sind, sondern eine solche Ausdehnung haben, daß die zusätzlichen Brüche durch die zweite Nuklease keine nennenswerte Erhöhung des löslichen Anteils zur Folge haben.

Ein anderer Versuch, die Anreicherung des Satellitenchromatins zu verbessern, geht von der Überlegung aus, daß auch innerhalb des unlöslichen Chromatinanteils das Satellitenchromatin das andere Chromatin an Größe deutlich übertreffen sollte. Um aber diesen Größenunterschied zu einer Trennung nach Größe ausnutzen zu können, mußte das Chromatin zuerst gelöst werden. Dies gemäß Bernstine (3) durch Zugabe von 0,6 M NaCl zu bewerkstelligen, ist problematisch, da mit der Ablösung des Histons H_1 bei dieser Salzkonzentration weitere Strukturveränderungen auftreten (30). Stattdessen wurde versucht, durch schonende Verdauung des unlöslichen Chromatins mit Nukleasen eine Solubilisierung herbeizuführen und anschließend das Material durch Zentrifugation in einem Saccharosegradienten nach Größe zu trennen. Wie erwartet, befand sich dabei das Satellitenchromatin bevorzugt in den rasch sedimentierenden Fraktionen, dennoch war sein relativer

Anteil nicht wesentlich gestiegen. Offensichtlich geht bei der Solubilisierung doch präferentiell Nicht-Satellitenchromatin in Lösung, so daß ein Teil der Anreicherung des ersten Schrittes (Verdauung von Kernen mit Hae III) wieder verloren geht.

Der eingangs beschriebene komplementäre Ansatz, nämlich Verdauung des Chromatins mit einer Nuklease, die Satelliten-DNA sehr häufig spaltet, wurde ebenfalls unternommen. Dabei wurde Sau 96 eingesetzt, eine Restriktionsnuklease, die Mäuse-Satelliten-DNA in regelmäßigem Abstand von 240 bp spaltet (5 und W. Hörz, unveröffentlicht), ähnlich wie Eco RII (11). Allerdings spaltet diese Nuklease gemäß ihrer Erkennungssequenz 5'GGNCC 3' (N kann jedes der vier Nukleotide sein) die Hauptbanden-DNA ebenfalls häufig, nämlich im Durchschnitt alle 500 bp. Wie zu erwarten, spiegelt daher die Zusammensetzung des löslichen Chromatins im wesentlichen die des Zellkernes wider. Umgekehrt zeigt dieses Ergebnis, daß sich die Zugänglichkeit des Heterochromatins kaum von der des Gesamtchromatins unterscheidet.

Einen ersten Schritt in Richtung der Charakterisierung des Satellitenchromatins stellt die Untersuchung der Histonzusammensetzung dar. Es ergaben sich dabei keine Unterschiede zum Gesamtchromatin, im Einklang mit den Ergebnissen von Johmann et al. (14). Allerdings war in jenen Versuchen Heterochromatin nach herkömmlichen Methoden mit Ultraschall und differentieller Zentrifugation isoliert worden. Das sind Bedingungen, unter denen eine Proteinumverteilung nicht ausgeschlossen ist (21).

8. Materialien und Methoden

8.1. Enzyme

Die Restriktionsnuklease Hae III wurde freundlicherweise von U. Hänggi zur Verfügung gestellt, der sie nach der Prozedur von Roberts et al. (27) reinigte. Micrococcus-Nuklease wurde von Firma Worthington (Freehold, N.J.) geliefert. Die Restriktionsnukleasen Alu, Eco RII und Sau 96 wurden wie in den Referenzen 28, 34, 32 beschrieben hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Aktivität von Eco RII wurde wie in Ref. 31 bestimmt.

8.2. Präparation von Zellkernen aus Mäuseleber

Die Präparation von Zellkernen aus Mäuseleber erfolgte wie in Ref. 24 beschrieben. Sie geht zurück auf die in Ref. 8 angewandte Methode, die Polyamine statt divalenter Kationen zur Stabilisierung der Zellkerne vorsieht.

8.3. Spaltung des Chromatins mit Restriktionsnukleasen und Micrococcus-Nuklease

Eingefrorene und bei -20°C aufbewahrte Zellkernpräparationen, die jeweils etwa 1,5 mg DNA enthielten, wurden in 250 μl Puffer, bestehend aus 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 15 mM β -Mercaptoäthanol, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 10 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 15 mM Tris-HCl, pH 7,4 (ähnlich

wie in Ref. 24) suspendiert und mit Restriktionsnukleasen inkubiert. Für Inkubationen mit Micrococcus-Nuklease wurde MgCl_2 durch 1,4 mM CaCl_2 ersetzt. Für Spaltungen von Chromatin mit Eco RII wurde der oben beschriebene Puffer auf einen pH von 8,2 eingestellt. Alle Spaltungen wurden durch EDTA in Mengen, die zur 1,5- bis 2-fachen Kompensation von Mg^{++} bzw. Ca^{++} notwendig waren, beendet.

8.4. Extraktion des löslichen Chromatins

Die Kerne wurden nach der Spaltung 5 Min. bei 6000 U/min, 0°C abzentrifugiert, mit etwa 1 ml/mgDNA 0,2 mM EDTA / 0,5 mM Tris-HCl, pH 7,5 versetzt und der lösliche Anteil durch mechanische Bewegung im Rotationsmischer extrahiert.

Zur Trennung des löslichen vom unlöslichen Material wurde das Chromatin danach 10 Min. bei 6000 U/min und 0°C zentrifugiert und der Überstand mit dem löslichen Chromatin abgenommen. Die Extraktion wurde in gleicher Weise zweimal wiederholt. Die DNA-Menge des jeweiligen löslichen Anteils wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt. In den meisten Fällen ließ sich bei der dritten Extraktion keine DNA mehr im Überstand nachweisen, d.h. das lösliche Chromatin war fast vollständig in den Überständen der beiden ersten Extraktionen enthalten, während der unlösliche Chromatinanteil als Pellet zurückblieb.

8.5. DNA-Isolierung aus Chromatinfractionen

Die Darstellung der DNA erfolgte durch Verdauung des Chromatins mit 1 mg/ml Proteinase K in 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA,

0,2% - 0,5% SDS, bei 37°C mindestens eine halbe Stunde, für unlösliches Chromatin besser länger. Im Falle des löslichen Chromatins wurden die erwähnten Reagenzien in den genannten Endkonzentrationen hinzugegeben, unlösliches Chromatin wurde in einer Konzentration von 0,5 - 1 mg DNA pro ml Lösung mit Proteinase K behandelt. Anschließend wurden sämtliche Proben mit NaCl in einer Endkonzentration von 0,2 M versetzt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Vol. Äthanol mindestens 5 Std. bei -20°C ausgefällt. Nach der Fällung wurden die Proben mit 70% Äthanol (hergestellt aus 95% Äthanol mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 0,2 mM EDTA) gewaschen und in der Lyophilise getrocknet.

Danach wurde die DNA in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 1 mM EDTA aufgenommen (etwa 0,2 - 1 mg DNA pro ml Lösung gemäß der geschätzten Menge) und ihre Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

8.6. Spaltung der DNA mit Eco RII oder Sau 96 zur quantitativen Bestimmung des Satelliten-DNA-Anteils

5 µg isolierter DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden wie in Ref. 11 in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-Mercaptoäthanol mit 3200 U/ml Eco RII bei 37°C 2 - 3 Std. inkubiert. Spaltung mit Sau 96 erfolgte in 6 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM β-Mercaptoäthanol, 6 mM NaCl, 15 mM MgCl₂.

Die Inkubationen wurden durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 15 - 20 mM beendet. Anschließend wurde die DNA wie unter 8.4 beschrieben alkoholgefällt, gewaschen, getrocknet und in 15 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 1 mM EDTA aufgenommen und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Wurde die DNA nach der Proteinverdauung (vgl. 8.5) aus großen Volumina ausgefällt (etwa > 200 µl) und danach in relativ kleinem Volumen aufgenommen, so fiel SDS in Mengen mit aus, die bei der Spaltung der DNA mit Eco RII die Aktivität dieses Enzyms stark beeinträchtigten. Deshalb wurde in diesen Fällen SDS durch Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Dazu wurde die DNA nach der Proteinverdauung wie beschrieben alkoholgefällt, gewaschen, getrocknet und in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 1 mM EDTA aufgenommen. Hinzugegeben wurden NaCl in einer Endkonzentration von 1 M und 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 v, v). Nach Zentrifugation trennten sich zwei Phasen, die obere mit der DNA wurde abgenommen und alkoholgefällt. Die gefällte DNA wurde in 70% Äthanol (aus 95% Äthanol und 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 1 mM EDTA) gewaschen, in der Lyophilise getrocknet und anschließend in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 1 mM EDTA aufgenommen. Für Aufarbeitungen von Chromatin aus Dichtegradientenzentrifugation wurde das Verfahren etwas abgewandelt (Kap. 8.9).

8.7. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Größenverteilung der DNA sowohl aus Chromatinfractionen als auch nach Spaltung mit Eco RII wurden je 2 - 5 µg DNA auf 1,5 - 2% Agarose-Plattengele (im Format 14 x 24 x 0,25 cm) aufgebracht (24). Als Elektrophoresepuffer diente TEB-Puffer wie in Ref. 23 beschrieben. Die Auftrennung der DNA erfolgte für 2 - 3 Std. bei 100 V. Zur Anfärbung der DNA wurde dem Puffer 1 µg/ml Äthidumbromid beigegeben oder das Gel nach der Elektrophorese in 1 µg/ml Äthidumbromid 30 Min. gefärbt. Die Gele wurden unmittelbar nach der Elektrophorese bzw. Färbung photographiert.

8.8. Photographie und Densitometrie

a) Photographie

Die gefärbten Gele wurden im UV-Durchlicht unter Verwendung einer Plattenkamera (Durst Laborator 138S) mit Gevatone Pan Graphic P 230 p - Film (Agfa-Gevaert; 17,8 x 12,7 cm) durch Rotfilter photographiert. Standardbelichtung war 50 Sek. bei Blende 2,8. Zur Bestimmung der Schwärzungskurve des jeweiligen Negativs wurde zuerst ein Graukeil, der einen Extinktionsbereich von 0 - 3 in Stufen zu je 0,2 umfaßte, auf einer Fluoreszenzfolie befestigt und auf das selbe Negativ 3 Sek. bei Blende 11 photographiert. Um Streulicht zu vermeiden, wurde der Bereich um den fluoreszierenden Graukeil sorgfältig abgedeckt. Nach der Belichtung des Graukeils wurde dieser vollständig verdeckt und das Gel wie angegeben photographiert.

Das Negativ wurde mit G 5 p - Entwickler (Agfa-Gevaert) 2,5 - 4,5 Min. bei 20° - 22°C entwickelt und anschließend fixiert.

b) Densitometrie

Aus den Negativen wurden die einzelnen Gelbahnen und der Graukeil ausgeschnitten und in einem Gilford-Scanner densitometriert. Als Bezugspunkt für die Extinktion $E = 0$ diente unbelichteter, aber unter den gleichen Bedingungen wie das jeweilige Negativ entwickelter Film (z.B. der unbelichtete Rand des Negativs). Es wurde entweder direkt die Extinktion des Negativs oder der Wert $10^{E/\lambda}$ über ein Zusatzgerät bestimmt (s. Kap. 2).

8.9. Zentrifugation von Chromatin im Saccharosegradienten

Die Fraktionierung von Chromatin im Saccharosegradienten erfolgte ähnlich wie in Ref. 18. Die Gradientenlösungen enthielten 5,1% bzw. 29,1% (w/v) Saccharose in 0,5 mM Tris-HCl, pH 8,0 / 0,2 mM EDTA. Mit Micrococcus-Nuklease oder Eco RII solubilisiertes Chromatin (vgl. Abb. 7) wurde aufgetragen und 3,5 Std. bei 40000 U/min und 4°C mit einem SW 41 - Rotor in der Beckman-Spinco Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten mit einer 40% Tartrat-Lösung von unten nach oben ausgepumpt und die Absorption bei 260 nm kontinuierlich in einer Durchflußküvette gemessen.

Das Material wurde in Fraktionen zu 500 µl gesammelt und Chromatin nach Zugabe von NaCl ad 0,2 M mit 2,5 Vol. Äthanol ausgefällt. Nach mindestens 5 Std. Fällung wurden die Proben 15 Min. zentrifugiert (0°C, 6000 U/min), in Äthanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und in der Lyophilise getrocknet. Danach wurden die Proteine in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% SDS, 1mM EDTA mit 1 mg/ml Proteinase K verdaut. Nach erneuter Alkoholfällung und Auswaschen in Äthanol wurde das Material in 40 µl pro Fraktion 1 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen, die jeweils benachbarten Fraktionen wurden vereinigt, in 1 M NaCl mit 1 Vol. Chloroform extrahiert und alkoholgefällt. Nach der Fällung wurde das Material mit Alkohol gewaschen, lyophilisiert, in einem Gesamtvolumen von je 30 µl 1 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen und direkt auf einem Agarosegel analysiert bzw. durch Spaltung mit Eco RII auf seinen Gehalt an Satelliten-DNA untersucht.

8.10. Analyse der Histonzusammensetzung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Darstellung der Histone wurden diskontinuierliche Platten-Polyacrylamidgele, deren Zusammensetzung sich an Ref. 16 orientierte, verwendet. Das Trenngel enthielt 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 13% Acrylamid, 0,75% Bis-Acrylamid, 0,1% TEMED, 0,05% Persulfat. Vor der Zugabe von TEMED und Persulfat wurde das gelöste Acrylamid filtriert und entgast. Das Sammelgel war zusammengesetzt aus 0,135 M Tris-HCl, pH 6,8, 3% Acrylamid, 0,2% Bis-Acrylamid, 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,05% Persulfat. Vor der Zugabe von TEMED und Persulfat wurde ebenfalls filtriert und entgast.

Als Elektrodenpuffer diente 0,025 M Tris, 0,192 M Glyzin, 0,1% SDS. Die verwendeten Proben wurden vor der Trennung in 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% Glyzerin, 5 mM Dithioerythrit, 0,005% Bromphenolblau aufgenommen und 5 Min. auf 100°C erhitzt. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 12 - 14 Std. bei einer Anfangsspannung von 50 - 70 V, die nach zwei Stunden auf 120 - 150 V gesteigert wurde.

Nach Ende der Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie Blue G-250 gemäß Ref. 6 gefärbt und bei 600 nm im Gilford-Scanner direkt densitometriert (Bestimmung von E).

9. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Charakterisierung von Satelliten-DNA enthaltenden Chromatinfractionen (Heterochromatin) aus Mäuseleberzellkernen, in denen diese etwa 8 % des Gesamtchromatins darstellen. Mäuseleberzellkerne wurden mit verschiedenen Restriktionsnukleasen verdaut, danach wurde eine Fraktionierung in lösliche und unlösliche Anteile durchgeführt. Ziel war eine präparative Darstellung von Satellitenchromatinfractionen.

Durch Spaltung mit der Restriktionsnuklease Hae III, einer Nuklease, die Mäuse-Satelliten-DNA nur in geringem Umfang spaltet, lassen sich maximal 70 - 80% des Chromatins in lösliche Anteile überführen. Dabei verbleibt fast der gesamte Satelliten-DNA-Anteil in der unlöslichen Fraktion, von der er dann 30 - 40% ausmacht.

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen DNA-Fractionen im Agarosegel wurde dieses mit Äthidiumbromid gefärbt, im UV-Durchlicht photographiert und das Negativ densitometriert. Bei der Densitometrie mußte ein neues Verfahren entwickelt werden, das die logarithmische Natur des photographischen Prozesses und die Schwärzungscharakteristik des Films berücksichtigt. Dazu wurde an Stelle der Extinktion E der Wert von $10^{E/\lambda}$, der ein direktes Maß für die DNA-Menge darstellt, gemessen. (λ ist ein Charakteristikum des Films.) In den Densitogrammen lassen sich die relativen Anteile der DNA-Fractionen als Flächen direkt erfassen.

Versuche, reines Satellitenchromatin zu isolieren, gingen in zwei Richtungen. Zum einen wurde das unlösliche Chromatin nach Solubilisierung mit Nukleasen im Saccharosegradienten fraktioniert. Wie erwartet befand sich das Satellitenchromatin in den rasch sedimentierenden Fractionen, war dort aber nicht angereichert im Vergleich zu dem Ausgangsmaterial. Zum anderen wurde

versucht, durch sequentielle Chromatinspaltung mit einer zweiten Restriktionsnuklease, die Mäuse-Satelliten-DNA ebenfalls kaum spaltet, reineres Satellitenchromatin zu erzielen. Obwohl der Abbau nach Doppelspaltung gegenüber Verdauung mit Hae III alleine deutlich gesteigert war, war der Anteil des Chromatins, der in Lösung gegangen war, nicht wesentlich erhöht, und entsprechend blieb der Anteil des Satellitenchromatins in der unlöslichen Fraktion bei knapp 40%.

Ein Vergleich der Histonzusammensetzung zwischen der löslichen und der unlöslichen Chromatinfraction nach Spaltung mit Hae III zeigte keine signifikanten Unterschiede, insbesondere war der relative Anteil des Histons H_1 in beiden Fraktionen gleich.

Des weiteren wurde das Verhalten von Mäuseleberchromatin gegenüber Sau 96, einer Restriktionsnuklease, die Mäuse-Satelliten-DNA sehr häufig spaltet, geprüft. Es zeigten sich unter den Versuchsbedingungen weder unterschiedliche Zugänglichkeit noch ein unterschiedliches Löslichkeitsverhalten des Satellitenchromatins gegenüber Gesamt-Chromatin, so daß zwar vor allem bei niedrigen Nukleasekonzentrationen Satellitenchromatin auf Grund des stärkeren Abbaus bevorzugt in Lösung ging, dies aber bei höheren Sau 96-Konzentrationen nicht mehr der Fall war.

Die unternommenen Versuche haben die Möglichkeit aufgezeigt, Mäuse-Heterochromatin in präparativem Maßstab durch spezifische Spaltung mit Restriktionsnukleasen darzustellen und tragen zum weiteren Verständnis der Struktur des Chromatins bei.

10. Literaturverzeichnis

1. R. Appels, W.J. Peacock, Int.Rev.Cytol.Suppl. 8, 69-126 (1978)
2. C. Benyajati, A. Worcel, Cell 9, 393-407 (1976)
3. E.G. Bernstein, Exp. Cell Res. 113, 205-208 (1978)
4. P.R. Cook, I.A. Brazell, Eur. J. Biochem. 84, 465-477 (1978)
5. G. Dover, Nature 272, 123-124 (1978)
6. G. Fairbanks, T.L. Steck, D.F.H. Wallace, Biochemistry 10, 2606-2617 (1971)
7. J.H. Frenster, V.G. Allfrey, A.E. Mirsky, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 1026-1032 (1963)
8. D.R. Hewish, L.A. Burgoyne, Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504-510 (1973)
9. W. Hörz, T. Igo-Kemenes, W. Pfeiffer, H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. 3, 3213-3226 (1976)
10. W. Hörz, I. Hess, H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 45, 501-512 (1974)
11. W. Hörz, H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 73, 383-392 (1977)
12. T. Igo-Kemenes, W. Greil, H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. 4, 3387-3400 (1977)
13. T. Igo-Kemenes, H.G. Zachau, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 109-118 (1978)
14. G. Johmann, R.A. Eckhardt, M.A. Gorovsky, J. Cell Biol. 58, 119-125 (1973)
15. S. Kit, J. Mol. Biol. 3, 711-716 (1961)
16. U.K. Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)
17. L. Lipchitz, R. Axel, Cell 9, 355-364 (1976)
18. K.S. McCarty Jr, R.T. Vollmer, K.S. McCarty, Anal. Biochem. 61, 165-183 (1974)
19. P.R. Musich, F.L. Brown, J.J. Maio, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3297-3301 (1977)
20. M. Nakane, T. Ide, K. Anzai, S. Ohara, T. Andoh, J. Biochem. (Tokyo) 84, 145-157 (1978)
21. M. Noll, J.D. Thomas, R.D. Kornberg, Science 187, 1203-1206 (1975)
22. J.R. Paulson, U.K. Laemmli, Cell 12, 817-828 (1977)

23. A.C. Peacock, C.W. Dingman, Biochemistry 6, 1818-1827 (1967)
24. W. Pfeiffer, W. Hörz, T. Igo-Kemenes, H.G. Zachau, Nature 258, 450-452 (1975)
25. A. Prunell, F. Strauss, B. Leblanc, Anal. Biochem. 78, 57-65 (1977)
26. D.E. Pulleyblank, M. Shure, J. Vinograd, Nucl. Acids Res. 4, 1409-1418 (1977)
27. R.J. Roberts, J.B. Breitmeyer, N.F. Tabachnik, P.A. Myers, J. Mol. Biol. 91, 121-123 (1975)
28. R.J. Roberts, P.A. Myers, A. Morrison, K. Murray, J. Mol. Biol. 102, 157-165 (1976)
29. E.M. Southern, J. Mol. Biol. 94, 51-69 (1975)
30. M. Steinmetz, H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 83, 615-628 (1978)
31. R.E. Streeck, H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 89, 267-279 (1978)
32. J.S. Sussenbach, P.H. Steenbergh, J.A. Rost, W.J. van Leeuwen, J.D.A. van Emlden, Nucl. Acids Res. 5, 1153-1163 (1978)
33. M. Waring, R.J. Britten, Science 154, 791-794 (1966)
34. R.N. Yoshimori, Dissertation, Univ. of California (1971)
35. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., Band 42 (1977)
36. Agfa-Gevaert AG, Sensitometrie in der Schwarzweiß- und Farbphotographie, Verf. J.F.A. Schmonsees (1972)

11. Abkürzungsverzeichnis

A, C, G, T	Desoxyribonukleotide
A-260-Einheit	Die in einem ml einer Lösung enthaltene Menge, die in einer 1 cm-Küvette bei 260 nm die Absorption 1 ergibt
Alu	Restriktionsendonuklease aus <i>Arthrobacter luteus</i>
Bis-Acrylamid	NN'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
Eco RI	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli</i> RY 13
Eco RII	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli</i> R 245
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
EGTA	Bis-(aminoäthyl)-glycoläther-NNN'N'-tetraessigsäure, 3, 6,-Dioxaoctamethyleninitrilo-tetraessigsäure
Hae III	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus aegyptius</i>
Hinf I	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i> R _f
Min.	Minute(n)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Ref.	Referenz
RNA	Ribonukleinsäure
Sau 3A	Restriktionsendonuklease aus <i>Staphylokokkus aureus</i> 3A
Sau 96	Restriktionsendonuklease aus <i>Staphylokokkus aureus</i> PS 96

SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
SFB	Sonderforschungsbereich
Std.	Stunde(n)
TEB	Tris-EDTA-Borat-Puffer
TEMED	NNN'N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen

Lebenslauf

Am 2. Mai 1954 wurde ich als Sohn des Syndikus Dr. jur. Walter Freiherr von Oefele und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Freundorfer, in München geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule an der Haldenbergerstr. in München, anschließend neun Jahre das Wittelsbacher Gymnasium, ebenfalls in München, wo ich 1973 in der humanistischen Abteilung die Reifeprüfung ablegte. Seit dem Sommersemester 1974 studiere ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Humanmedizin. In den Jahren 1978 und 1979 fertigte ich die vorliegende Arbeit an.

